

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

2/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007885663

WPI Acc No: 1989-150775/198920

Vectors activatable by retro-viral trans-activator - for prodn. of  
indicator cells for retrovirus detection, esp. in AIDs diagnosis

Patent Assignee: INSERM INST NAT SANTE & RECH MED (INRM ); INST PASTEUR  
(INSP )

Inventor: BONNEROT C; NICOLAS J F

Number of Countries: 015 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 8903878	A	19890505	WO 88FR514	A	19881019	198920 B
FR 2621924	A	19890421	FR 8714384	A	19871019	198923
DK 8903002	A	19890616				198938
EP 336956	A	19891018	EP 88909550	A	19881019	198942
JP 2501621	W	19900607	JP 88508825	A	19881019	199029

Priority Applications (No Type Date): FR 8714384 A 19871019

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; EP 233764

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 8903878 A F 27

Designated States (National): DK JP US

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL OA SE  
EP 336956 A F

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Abstract (Basic): WO 8903878 A

Vectors capable of transforming host cells into indicator cells for detection of a retrovirus comprises a recombinant sequence produced by fusing (a) a sequence which is derived from the genome of the retrovirus and is activated by the trans activator of the retrovirus with (b) a heterologous marker gene. The recombinant sequence is under the control of a promoter which is present in the vector and permits expression of the marker gene in host cells injectable by the retrovirus, and is deficient in the essentials of the sequence coding for the trans activator. The marker gene codes for an enzyme which, when produced in cells upon activation by the trans activator, produces a change in colour or absorption spectrum, either directly or by acting on a substrate penetrating into the cells.

USE - The indicator cells are esp. useful for early detection of HIV in the diagnosis of AIDS.

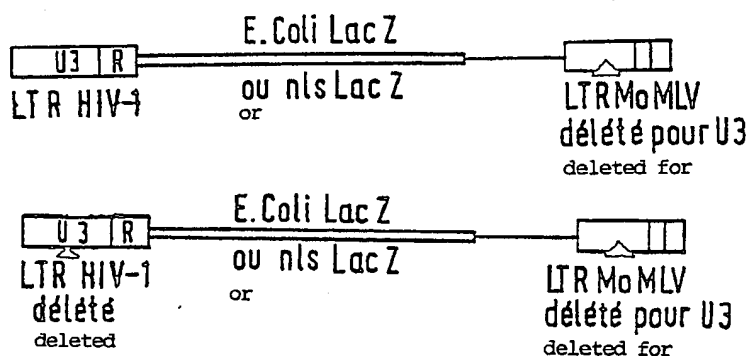
Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12N-005/00;  
C12N-007/00; C12N-015/00; C12Q-001/04; G01N-033/56



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>4</sup> :</b>  <b>C12N 15/00, 7/00, 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 89/ 03878</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 5 mai 1989 (05.05.89)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR88/00514 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 19 octobre 1988 (19.10.88)  <b>(31) Numéro de la demande prioritaire:</b> 87/14384 <b>(32) Date de priorité:</b> 19 octobre 1987 (19.10.87) <b>(33) Pays de priorité:</b> FR  <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> NICOLAS, Jean-François [FR/FR]; 39, chemin de la Source, F-78590 Noisy-le-Roi (FR). BONNEROT, Claire [FR/FR]; 5 bis, rue de Solferino, F-75007 Paris (FR).		<b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc.; S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud, 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), BJ (brevet OAPI), CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> DEFECTIVE RECOMBINANT GENE WHICH CAN BE ACTIVATED BY A TRANSACTIVATOR <b>(54) Titre:</b> GENE RECOMBINANT DEFECTIF ET ACTIVABLE PAR UN TRANSACTIVATEUR		
<b>(57) Abstract</b>  The invention concerns means (products and processes) applicable to the <i>in vitro</i> detection of the presence of an infectious retrovirus in a biological specimen, in particular of an AIDS virus (HIV). These means consist, in particular, of cells which are susceptible to infection by HIV and which include a recombinant gene containing a DNA corresponding essentially to the totality of the genome of a retrovirus having a gene which can be activated by a retroviral transactivator controlled by a promoter. Said DNA, however, does not contain the coding sequence for the retroviral transactivator but does contain a heterologous marker controlled by a promoter, in this case LTR <sup>5</sup> , which is normally associated with the coding sequences for the <i>gag</i> , <i>pol</i> and <i>env</i> proteins. The activation of the marker indicates the presence of infectious retrovirus in the specimen.  <b>(57) Abrégé</b>  L'invention concerne des moyens (produits et procédés) applicables à la détection <i>in vitro</i> de la présence d'un rétrovirus infectieux dans un échantillon biologique, notamment d'un virus du SIDA (HIV). Ces moyens consistent notamment en des cellules sensibles à l'infection par le HIV et qui comporte un gène recombinant qui contient un ADN correspondant essentiellement à la totalité du génome d'un rétrovirus comportant un gène activable par un transactivateur rétroviral placé sous le contrôle d'un promoteur, cet ADN étant cependant, d'une part, dépourvu de la séquence codant pour le transactivateur rétroviral et, d'autre part, pourvu d'un marqueur hétérologue placé sous le contrôle du promoteur, en l'occurrence le LTR <sup>5</sup> , normalement associé aux séquences codant pour les protéines <i>gag</i> , <i>pol</i> et <i>env</i> . La présence de rétrovirus infectieux dans l'échantillon se manifeste par l'activation du marqueur.		



**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

Gene recombinant défectif et activable par un transactivateur.

L'invention concerne des moyens (produits et procédés) applicables à la détection in vitro de la E 45 présence d'un rétrovirus infectieux dans un échantillon biologique, notamment dans un prélèvement provenant d'un patient ou porteur présumé du rétrovirus. Une application préférée de l'invention s'adresse à la détection d'un virus du SIDA (HIV) ou de séquences nucléiques de ce rétrovirus dans de tels échantillons biologiques.

Dans une autre variante d'application, l'invention a pour but de permettre l'étude de l'influence d'agents extérieurs, notamment de principes actifs de médicaments susceptibles d'inhiber, à tout le moins moduler, le caractère infectieux in vivo du rétrovirus étudié.

La mise au point d'un système de détection directe et ultrasensible plus particulièrement des virus HIV devient urgente. Les tests de séro-positivité mettant en oeuvre la détection d'anticorps contre le rétrovirus HIV chez les porteurs éventuels peuvent s'avérer insuffisants, compte tenu de l'observation qui a été faite que les anticorps recherchés n'apparaissent souvent chez le sujet infecté par le virus HIV qu'après une durée d'incubation de 12 à 18 mois. D'autres tests actuellement utilisés, tels que la détection et le dosage de l'activité reverse transcriptase du virus éventuellement présent dans les prélèvements étudiés ne présentent pas toujours le degré de sensibilité voulue pour conclure utilement à l'infection ou non du sujet dont provenait le prélèvement.

L'invention a pour but de remédier au moins en grande partie aux inconvénients des tests existant, n-

amment de fournir des moyens et des procédés extrêmement sensibles de détection d'une infection rétrovirale et ce même à un stade très précoce de l'infection.

En particulier, un premier but de l'invention est de permettre la détection, in vitro, de l'existence ou non d'une infection rétrovirale chez un hôte (humain ou animal) sensible à ladite infection rétrovirale, et ce même à un stade très précoce de l'évolution de cette infection.

Un autre but de l'invention est l'étude de l'influence d'agents extérieurs sur la capacité d'infection des lignées cellulaires par ce rétrovirus provenant de cet hôte (ou apparentées à celles-ci), par exemple de principes actifs de médicaments visant à inhiber le caractère infectieux in vivo de ce rétrovirus. Mais ces agents extérieurs peuvent aussi consister en d'autres facteurs, susceptibles au contraire d'accélérer l'infection rétrovirale.

D'autres buts encore de l'invention sont de permettre la détection de la capacité d'un rétrovirus déterminé à infecter une lignée cellulaire donnée, ou l'identification de ceux des clones cellulaires qui, au sein d'une culture cellulaire, sont infectables par ce rétrovirus ou encore l'étude in vitro de la capacité potentielle d'agents divers, parmi lesquels des principes actifs de médicaments potentiels d'affecter l'infection rétrovirale de cellules sensibles exposées au rétrovirus étudié.

L'invention met à profit la capacité que possèdent des rétrovirus recombinants (ou des gènes recombinants issus de ces rétrovirus) contenant un gène exogène dont l'expression est recherchée, à s'incorporer dans le génome de cellules individuelles infectables par le rétrovirus sauvage correspondant et à permettre l'expression du gène exogène, le cas échéant dans des conditions d'activation

appropriées, dans les cellules individuelles infectées auxquelles le recombinant rétroviral a été incorporé, ce gène exogène étant transmissible d'une génération cellulaire à l'autre.

L'invention met en outre à profit le fait que l'activité génique de plusieurs rétrovirus, notamment de rétrovirus humains et de mammifères supérieurs (HTLV, BLV), dépend en général d'une trans-activation (ou trans-stabilisation) par une protéine virale codée par un gène endogène faisant partie du gène rétroviral. Par exemple dans le cas des rétrovirus HIV, l'activité génique du virus dépend d'une trans-activation (ou trans-stabilisation) par le gène HIV-tat (également connu sous la dénomination "gène Q"), l'une au moins des cibles de la protéine codée par le gène tat étant constituée par une séquence contenue dans la région R, elle-même normalement dans la région LTR<sup>5'</sup> du génome rétroviral. La trans-activation (ou trans-stabilisation) du rétrovirus sous le contrôle du gène tat est une condition essentielle à une réplication efficace du rétrovirus, en particulier au niveau de la transcription des gènes codant pour les protéines gag, env et pol. L'absence de trans-activation n'est pas un obstacle total à la capacité de réplication virale. Néanmoins il peut être estimé que l'efficacité de réplication sous l'effet de cette trans-activation est de 500 à 1 000 fois supérieure à celle d'un rétrovirus défectif au niveau de la région tat.

Le procédé de détection de l'invention d'une infection rétrovirale repose sur l'idée d'assurer dans des cellules contenant déjà une séquence génique ou un provirus défectif au niveau de la région tat (ou de la région analogue s'agissant d'un autre rétrovirus), la susdite trans-activation ou trans-stabilisation par un apport extérieur (en "trans") d'un trans-activateur codé par la région tat du génome rétroviral du rétrovirus éventuellement

présent dans l'échantillon ou prélèvement biologique à étudier. Pour parvenir à cette fin, l'invention fournit également des moyens permettant la mise en oeuvre de ce procédé et la révélation de la trans-activation ainsi induite dans les cellules susdites, dès lors qu'elles ont été mises au contact de l'échantillon à étudier et infectées par le rétrovirus éventuellement présent dans cet échantillon.

L'invention concerne plus particulièrement un gène recombinant incorporable à des lignées cellulaires infectables par le rétrovirus dont la présence est recherchée, ce gène recombinant étant lui-même activable par un trans-activateur rétroviral du virus recherché, et plus particulièrement caractérisée :

- en ce qu'il comporte une séquence recombinante résultant de la fusion d'une séquence activable par ce trans-activateur, cette séquence étant dérivée du génome du rétrovirus homologue et fusionnée à un marqueur hétérologue, ladite séquence recombinante étant elle-même placée sous le contrôle d'un promoteur présent dans le gène recombinant et permettant l'expression du marqueur dans un hôte cellulaire sensible, infectable par le rétrovirus sauvage correspondant ;

- en ce que ce gène recombinant est dépourvu de l'essentiel de la séquence codant pour le susdit trans-activateur rétroviral.

L'invention concerne donc aussi les cellules auxquelles le susdit gène recombinant activable a été incorporé, que ce soit par transfection ou infection de ces cellules avec un vecteur contenant le susdit gène recombinant activable dans des conditions permettant l'expression d'un marqueur hétérologue au sein de cette cellule ou de ces cellules.

Avantageusement dans une forme de réalisation

préférée de ces cellules, le gène recombinant est incorporé à leur propre patrimoine génétique.

Dans une forme préférée du gène recombinant selon l'invention, le gène recombinant contient un ADN correspondant essentiellement à la totalité du génome d'un rétrovirus comportant un gène activable par un trans-activateur rétroviral placé sous le contrôle d'un promoteur, cet ADN étant cependant, d'une part, dépourvu de la séquence codant pour le trans-activateur rétroviral et, d'autre part, pourvu d'un marqueur hétérologue placé sous le contrôle du promoteur, en l'occurrence le LTR<sup>5'</sup>, normalement associé aux séquences codant pour les protéines gag, pol et env.

Les séquences codant pour les protéines gag, env, pol peuvent être délétées au moins en partie. En d'autres termes, et plus particulièrement dans le cas où le rétrovirus concerné est un virus HIV, le gène recombinant correspondant contient la région R d'un rétrovirus HIV et est dépourvu de la région tat d'un rétrovirus HIV.

L'invention concerne plus particulièrement un rétrovirus recombinant défectif dérivé d'un rétrovirus sauvage ou natif, contenant les éléments agissant en "cis" pour activer la transcription des séquences codant pour les protéines virales sous l'effet d'un transactivateur codant une autre région du génome rétroviral, ainsi que les parties agissant en "cis" du virus sauvage et assurant normalement l'empaquetage du rétrovirus, sa réverse-transcription en une molécule ADN et son intégration dans le génome de la cellule hôte, ainsi que le site de polyadénylation de cet ARN, ce rétrovirus recombinant étant plus particulièrement caractérisé en ce qu'il comporte :

- une délétion d'au moins une partie sinon de la totalité de la susdite région codant pour le susdit transactivateur du virus sauvage ou natif, la partie

délétée étant suffisamment importante pour que soit interdite la production endogène, dans la cellule-hôte, d'un polypeptide ayant la propriété d'activer les susdits éléments activateurs et

- une séquence codant pour un marqueur de cellules-hôtes infectées par le rétrovirus recombinant défectif ainsi constitué, soit à l'état incorporé à la région rétrovirale comportant normalement les gènes gag, pol et env, soit en remplacement de tout ou partie de cette région.

La mise en contact d'une cellule hôte ainsi infectée avec une préparation de virus sauvage ou natif induit alors l'expression des éléments activateurs, grâce à l'apport extérieur du trans-activateur. Lorsque le marqueur code pour une enzyme agissant sur un substrat colorable, les cellules marquées peuvent être identifiées grâce à leur coloration sélective.

Le promoteur sous le contrôle duquel est placée la séquence activable par le trans-activateur est un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire infectable. La séquence génique peut être limitée pour l'essentiel à la séquence codant pour le marqueur, placée sous le contrôle direct de la région U3 du LTR<sup>5'</sup> du rétrovirus. En variante encore, l'une ou l'autre des régions LTR, ou les deux à la fois, sont dépourvues de promoteur(s), la séquence génique codant pour le marqueur étant alors sous le contrôle d'un promoteur distinct remplaçant la région U3 de façon à ce que la transcription se fasse toujours à partir de la région R transactivatrice.

Par exemple un rétrovirus recombinant défectif conforme à l'invention, dérivé de HIV, comprend successivement :

- la région R du LTR<sup>5'</sup> du rétrovirus sauvage correspondant, précédée de la région U3 du LTR<sup>5'</sup> ou d'un promoteur

distinct substitué au précédent, cette région R étant, le cas échéant, suivie de la région d'empaquetage ;

- le site d'initiation de l'ARN correspondant aux protéines virales normalement codées par les gènes gag, pol et env ;
- la séquence codant pour le marqueur incorporée à la région rétrovirale comportant les gènes gag, pol et env, ou substituée à tout ou partie de cette région rétrovirale,
- une délétion ou une mutation dans la région tat, et
- la région LTR<sup>3'</sup>, qui coïncide avec le site de polyadénylation de l'ARN.

Les séquences géniques recombinantes ou rétrovecteurs défectifs recombinants selon l'invention peuvent être fabriqués par des techniques classiques en matière de génie génétique, notamment par recombinaison in vitro des éléments constitutifs caractéristiques entrant dans la séquence génique recombinante ou le rétrovirus défectif recombinant tels qu'ils ont été définis ci-dessus. A cet égard, l'invention concerne également les vecteurs recombinants contenant l'ADN du virus recombinant défectif sus-défini, incorporé à tout vecteur permettant l'amplification de l'ensemble dans un hôte cellulaire compétent, par exemple un plasmide bactérien.

L'invention concerne également les cellules ou lignées cellulaires infectables par le rétrovirus sauvage ou natif correspondant au rétrovirus dont certaines parties interviennent dans la séquence des susdits rétrovirus défectifs et séquences géniques, ces cellules étant elles-mêmes modifiées par incorporation dans leur propre patrimoine génétique desdites séquences géniques ou de provirus défectifs recombinants correspondant auxdits rétrovirus défectifs.

Ces cellules indicatrices peuvent être produites

par tout procédé classique, notamment par infection de cellules sensibles à l'infection par un rétrovirus défectif recombinant produit in vitro ou par transformation de ces mêmes cellules par un vecteur contenant la séquence génique recombinante ou la totalité du génome du rétrovirus défectif recombinant.

Les observations suivantes peuvent être faites quant aux divers éléments constitutifs de la séquence génique recombinante ou du rétrovirus défectif recombinant selon l'invention.

Le marqueur lui-même est avantageusement constitué par une enzyme produite dans les cellules transformées par le gène ou virus recombinant défectif, pour lui conférer une coloration particulière ou la capacité d'agir sur un substrat pénétrant dans les cellules transformées ou infectées, notamment de subir une modification de coloration ou plus généralement de son spectre d'absorption des radiations lumineuses, sous l'action de cette enzyme. A titre d'exemples d'enzymes codées par la séquence codante, contenue dans la séquence génique mise en oeuvre dans l'invention, on mentionnera la  $\beta$ -galactosidase, la  $\beta$ -glucuronidase ou la luciférase. Il va de soi que l'on peut avoir recours à toute autre séquence codante, dès lors qu'elle code pour une protéine susceptible de jouer le rôle de marqueur permettant de repérer aisément les cellules transformées.

L'utilisation de tels types de marqueurs dans le cadre de l'invention est particulièrement avantageux, en tant qu'elle permet une observation individualisée des cellules auxquelles les virus ou provirus défectifs recombinants sus-définis ont été incorporés, notamment à l'occasion de la révélation de l'expression du marqueur, par exemple dans les conditions décrites plus loin.

Il est avantageux, pour obtenir un marquage sensible, d'utiliser le marqueur qui sera localisé dans un

compartiment cellulaire aisément identifiable des cellules étudiées, l'ensemble formant la séquence génique sus-définie, elle-même placée sous le contrôle de la région LTR<sup>5'</sup> du rétrovirus concerné. Une séquence génique avantageuse comprend la séquence "nls-Lac Z" décrite par Kalderon, D. et al (1984), Cell 39, 499-509, et contenant une région signal de localisation de l'antigène T (nls) du virus de singe SV40 fusionnée au gène Lac Z, cette séquence nls-LacZ étant, par exemple, placée sous le contrôle du LTR<sup>5'</sup> du HIV. La protéine de fusion correspondante nls- $\beta$ -Gal est enzymatiquement active et reste associée avec le noyau des cellules auxquelles une telle séquence génique est incorporée, plus particulièrement avec les membranes des noyaux cellulaires desdites cellules, plutôt que de s'accumuler dans le nucléoplasme. On obtient ainsi une sensibilité maximale. Quand la lignée indicatrice est infectée par le virus sauvage, l'expression du gène LacZ peut être facilement détectée histochimiquement au niveau de la cellule. A chaque cellule de la lignée indicatrice LacZ infectée correspond alors une cellule  $\beta$ gal<sup>+</sup> décelable par marquage histochimique in situ.

Avantageusement, le promoteur sous le contrôle duquel est placée la séquence codant pour le marqueur est un promoteur faible ou affaibli. En particulier, un promoteur affaibli dérivé de la séquence du LTR<sup>5'</sup> de virus HIV est constitué par ce LTR lui-même, partiellement délété. En particulier, ce promoteur peut être délété d'une partie de la région U3, sans pour autant supprimer la totalité de l'activité promotrice de la région U3.

En effet, comme cela a été indiqué plus haut, la délétion de la région tat ne forme pas un obstacle total à la réplication du virus, cas dans lequel la protéine marqueur peut quelquefois être légèrement exprimée dans une lignée de cellules infectées par le rétrovirus défectif. L'affaiblissement du promoteur a pour but de rendre encore

plus faible l'expression du marqueur en l'absence de contact entre ces lignées cellulaires et un milieu extérieur contenant le rétrovirus sauvage. Il ne s'agit là que d'un perfectionnement non nécessaire, car même avec un promoteur non délété le degré d'expression du marqueur est à ce point plus élevé lorsque ces cellules sont mises au contact d'un apport en rétrovirus sauvage extérieur, que dans le cas où elle s'en trouve protégée que la confusion entre les degrés de marquage observables dans les deux cas est pratiquement impossible.

Le procédé selon l'invention pour la détection d'une infection rétrovirale dans un échantillon contenant des cellules éventuellement infectées (tel qu'un prélèvement de sérum humain contenant des lymphocytes T4, s'agissant d'apprécier s'il est infecté par un virus HIV) ou le milieu, tel qu'un surnageant de culture, avec lequel ces cellules avaient auparavant été en contact, est caractérisé par les étapes que constituent :

- la mise en contact de cet échantillon avec les cellules contenant la séquence génique selon l'invention, notamment un provirus défectif susceptible d'être lui-même transactivé par l'apport extérieur en rétrovirus éventuellement contenu dans l'échantillon, et ce dans des conditions (notamment de température et de durée d'incubation appropriées) permettant l'infection desdites cellules par le rétrovirus éventuellement présent dans l'échantillon, et
- la détection de l'infection éventuelle desdites cellules par révélation de l'expression du marqueur résultant de la transactivation de la séquence génique ou du provirus défectif présent dans ces dernières cellules, à l'aide d'un révélateur approprié.

Un tel procédé permet la détection très sensible, dans des délais très rapides, de la présence d'une infection rétrovirale dans l'échantillon cellulaire initial qui était à tester, et même le dosage du degré de l'infection

rétrovirale dans l'échantillon testé, au moment où le test a été réalisé.

On appréciera que ce test permet aussi d'étudier l'évolution de l'infection chez un patient atteint de la maladie induite par le rétrovirus sauvage, s'il est répété dans le temps, sur des prélèvements de sérums, de tout autre fluide ou tissu biologique infecté provenant de ce patient.

Ce procédé peut aussi être mis en oeuvre pour l'étude de l'efficacité éventuelle d'un principe actif de médicament vis-à-vis de l'interaction entre le rétrovirus considéré et des cellules sensibles, notamment lorsque la susdite mise en contact sus-indiquée est opérée en présence de ce principe actif. On apprécie que le test ainsi modifié permet à la fois de sélectionner le principe actif de médicament qui pourrait se révéler le plus actif, de déterminer les doses qui pourraient être efficaces pour traiter le patient ayant fourni le prélèvement, ces doses efficaces découlant notamment de celles qui, dans la mise en oeuvre du test sus-indiqué, n'autorisent pas l'infection des cellules contenant le rétrovirus ou provirus recombinant défectif au contact de prélèvements provenant du malade à traiter ou le surnageant du milieu dans lequel cet échantillon cellulaire avait été maintenu.

Plus généralement, l'invention permet l'étude in vitro de l'influence de facteurs susceptibles d'interférer avec l'infection virale, le procédé sus-défini comprenant alors la mise en contact des cellules contenant la séquence génique ou le provirus recombinant selon l'invention, en présence de ce facteur, avec des quantités déterminées de rétrovirus extérieur et la détection des doses de facteurs, notamment de principe actif de médicament, qui préviennent l'infection rétrovirale, détectable par l'activation du marqueur, desdites cellules.

L'invention concerne donc également des nécessaires ou kits permettant la mise en oeuvre du procédé qui vient d'être décrit, ces kits comportant :

- des cellules sensibles modifiées contenant le rétrovirus ou provirus recombinant défectif sus-défini,
- des moyens de révélation de l'expression du marqueur, notamment lorsque le marqueur est une enzyme, un substrat spécifique de l'enzyme,
- éventuellement les tampons et réactifs nécessaires à la réalisation de la mise en contact, avec l'échantillon biologique, des cellules contenant la séquence génique ou le rétrovirus recombinant défectif à étudier et l'incubation du mélange de réaction dans des conditions permettant l'infection éventuelle de ces cellules au contact de l'échantillon étudié,
- le cas échéant des milieux de conservation ou de culture desdites cellules saines et modifiées.

Avantageusement les cellules indicatrices utilisées dans ces kits sont constituées par des lignées cellulaires "immortalisées" infectables par le rétrovirus recombinant correspondant. Par exemple, dans le cas d'un kit destiné à la détection d'un virus HIV, lesdites cellules sensibles modifiées et les cellules saines appartiendraient toutes deux à des lignées cellulaires du type CEM, HUT, etc.

Dans les exemples indiqués plus loin, les possibilités de l'invention sont illustrées en rapport avec la production d'un virus recombinant défectif dérivé d'un virus HIV-1.

Il est donc tout à fait clair que l'invention s'adresse à la détection de tout type de rétrovirus éventuellement infectieux vis-à-vis de cultures cellulaires déterminées et présentant les caractéristiques essentielles de structure dont il a été question plus haut. En

particulier, elle s'applique à la fabrication de rétrovirus recombinants défectifs permettant, dans les conditions qui ont été indiquées, la détection du pouvoir infectieux (ou la modulation du pouvoir infectieux) des rétrovirus connus sous les dénominations HTLV I, HTLV II, HIV I (ou encore LAV ou HTLV III), HIV II (ou LAV II), HTLV IV. Il en est encore de même pour de nombreux rétrovirus infectieux à l'égard de l'animal. A titre d'exemple, on mentionnera les rétrovirus leucémiques des bovins (Bovine Leukemia Viruses) et des félins (FeLV).

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'exemples de réalisation, appliquée à la production de rétrovirus recombinants défectifs conformes à l'invention, dérivé de HIV-1.

D'autres buts de l'invention et les moyens qui permettent de les atteindre résulteront encore de la description de certains des modes de réalisation présentés, soit à titre préféré, soit à titre d'illustration des possibilités offertes par l'invention pour l'étude de tous les aspects des diverses interactions possibles entre des rétrovirus sauvages déterminés et des cellules indicatrices infectables par ces rétrovirus et de la modulation de ces interactions.

Il sera dans ce qui suit fait référence aux figures dans lesquelles :

- les figures 1a et 1b font apparaître de façon schématique les caractéristiques de séquences géniques recombinantes conformes à l'invention ;
- les figures 2a, 2b et 2c sont des représentations schématiques d'exemples de rétrovirus défectifs recombinants conformes à l'invention.

Les figures 1a et 1b sont illustratives de deux gènes recombinants conformes à l'invention, tous deux dépourvus de la région tat. Le gène recombinant de la

figure 1b se distingue de celui de la figure 1a par une délétion partielle du LTR<sup>5'</sup>. Ces gènes, incorporés dans le génome de cellules sensibles à l'infection par HIV, sont fonctionnels lorsque les cellules en cause sont placées au contact de source de virus HIV sauvage.

**EXEMPLES** : test de détection d'un rétrovirus sauvage de type HIV par trans-activation d'une copie défective intégrée dans une cellule infectable

L'ADN recombinant dont l'expression doit être amplifiée par la présence du produit du gène tat externe possède les éléments suivants :

1° un promoteur (pro dans la figure 2a) permettant la transcription d'une séquence susceptible d'être exprimée, placée sous son contrôle ;

2° la région R de HIV-1 jusqu'au site Hind III (nucléotide n° 83 selon WRIGHT et al., Science 234, p. 988 ou nucléotide n° 77 dans CSH, RNA tumor virus, tome 2, p. 1 104, 1985) comme démontré dans l'article de WRIGHT et al., Science 234, p. 988. Ce fragment contient en effet les éléments qui confèrent en cis la trans-activation par les produits du gène tat ;

3° un gène marqueur tel que par exemple le fragment de 3.3 kb du gène nls LacZ tel que décrit dans l'article de KALDERON et SMITH ;

4° un signal de polyadénylation de l'ARN.

Cette structure est schématisée en figure 2a.

Un autre exemple particulier est donné en figure 2b dans laquelle la séquence recombinante comprend le LTR complet d'un rétrovirus HIV-1 comportant donc le promoteur (U3), la région cis (R) nécessaire à la trans-activation, fusionnée par recombinaison génétique avec un fragment nls LacZ extrait à l'aide d'enzymes de restriction du vecteur L7RH $\beta$ gal décrit dans l'article de KALDERON et SMITH avant d'être placé par ligation in vitro sous la dépendance de la région R du LTR et relié, également par ligation, au

signal de polyadénylation du virus HBV.

Un autre exemple particulier est donné dans la figure 2c où l'ADN du provirus infectieux décrit dans l'article de M. MARTIN et al. (Journal of Virol., vol. 59, p. 284-291) a été fragmenté par les enzymes de restriction Sph1 (nucléotide n° 989 de la séquence publiée dans RNA tumor viruses, Cold Spring Harbor 1985) et BamHI (nucléotide 8 032, même référence) comme indiqué à la figure 2c et où le gène nls LacZ (fragment SalI BamHI du plasmide pMMuLVnls LacZ) a été mis à la place de gag, pol et env.

Ces fragments sont coupés, isolés et lignés comme indiqué dans MANIATIS.

Les plasmides décrits dans les figures 1a, 1b ou 2a, 2b, 2c peuvent être introduits, de préférence par co-transfection, en utilisant les méthodes habituelles décrites par exemple dans GRAHAM et VANDER Eb 19873, Virology 52, 456 et NICOLAS et BERG, CHS, Cell proliferation, 10, 469, dans des cellules infectables par le rétrovirus HIV sauvage, telles que les lignées de cellules Leu 3OKT4 auxquelles se réfère l'article de MALCOLM MARTIN ou CEM (CNCM I-416 et CNCM I-417) ou SuptI.

Quel que soit le gène recombinant introduit, il ne conduira qu'à une expression minimale du gène LacZ dans les cellules dans lesquelles il a été introduit. Une telle cellule (formant la cellule indicatrice) comporte une ou plusieurs copies de la construction LacZ. Ces cellules indicatrices peuvent alors être mises en oeuvre dans un test de détection dans un échantillon biologique d'un virus sauvage. L'infection d'une cellule indicatrice entraînera l'activation (en trans) du gène LacZ et, par conséquent, son expression.

Cette activation peut être mise en évidence par l'essai histochimique basé par exemple sur l'utilisation de X-gal selon la technique décrite par SANES et al. Embo J. 1986) qui permet une détection in situ de l'activité

16 .

$\beta$ -galactosidase. A chaque évènement d'infection par un virus sauvage correspondra une cellule  $\beta\text{gal}^+$  détectable au plus 48 heures plus tard.

Les virus présents dans les humeurs ou cellules de malade ou même dans les embryons humains peuvent ainsi être détectés de façon très rapide, et ce à un stade très précoce de l'infection rétrovirale.

REVENDICATIONS

1. Gène recombinant incorporable à des lignées cellulaires infectables par le rétrovirus dont la présence est recherchée, ce gène recombinant étant lui-même activable par un trans-activateur rétroviral du rétrovirus recherché, caractérisé :

- en ce qu'il comporte une séquence recombinante résultant de la fusion d'une séquence activable par ce trans-activateur, cette séquence étant dérivée du génome du rétrovirus homologue et fusionnée à un marqueur hétérologue, ladite séquence recombinante étant elle-même placée sous le contrôle d'un promoteur présent dans le gène recombinant et permettant l'expression du marqueur dans un hôte cellulaire sensible, infectable par le rétrovirus sauvage correspondant ;

- en ce que ce gène recombinant est dépourvu de l'essentiel de la séquence codant pour le susdit trans-activateur rétroviral.

- en ce que le marqueur lui-même est constitué par une enzyme qui, lorsqu'elle est produite dans les cellules transformées par le gène ou virus recombinant défectif, lui confère une coloration particulière ou la capacité d'agir sur un substrat pénétrant dans les cellules transformées ou infectées et subissant une modification de coloration ou plus généralement de son spectre d'absorption des radiations lumineuses, sous l'action de cette enzyme.

2. Gène recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient un ADN correspondant essentiellement à la totalité du génome d'un rétrovirus comportant un gène activable par un trans-activateur rétroviral placé sous le contrôle d'un promoteur, cet ADN étant cependant, d'une part, dépourvu de la séquence codant pour le trans-activateur rétroviral et, d'autre part, pourvu d'un marqueur hétérologue placé sous le

contrôle du promoteur, en l'occurrence le LTR<sup>5'</sup>, normalement associé aux séquences codant pour les protéines gag, pol et env.

3. Gène recombinant selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un HIV.

4. Gène recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué par un rétrovirus recombinant défectif comportant :

- une délétion d'au moins une partie sinon de la totalité de la susdite région codant pour le susdit transactivateur du virus sauvage ou natif, la partie délétée étant suffisamment importante pour que soit interdite la production endogène, dans la cellule-hôte, d'un polypeptide ayant la propriété d'activer les susdits éléments activateurs et

- une séquence codant pour un marqueur de cellules-hôtes infectées par le rétrovirus recombinant défectif ainsi constitué, soit à l'état incorporé à la région rétrovirale comportant normalement les gènes gag, pol et env, soit en remplacement de tout ou partie de cette région.

5. Rétrovirus recombinant défectif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la région R du LTR<sup>5'</sup> du rétrovirus sauvage correspondant, précédée de la région U3 du LTR<sup>5'</sup> ou d'un promoteur distinct substitué au précédent, cette région R étant, le cas échéant, suivie de la région d'empaquetage ;

- le site d'initiation de l'ARN correspondant aux protéines virales normalement codées par les gènes gag, pol et env ;

- la séquence codant pour le marqueur incorporée à la région rétrovirale comportant les gènes gag, pol et env, ou substituée à tout ou partie de cette région rétrovirale,

- une délétion ou une mutation dans la région tat, et
- la région LTR<sup>3'</sup>, qui coïncide avec le site de polyadénylation de l'ARN.

6. Gène recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le marqueur est la  $\beta$ -galactosidase.

7. Cellules ou lignées cellulaires infectables par le rétrovirus sauvage ou natif correspondant au rétrovirus dont certaines parties interviennent dans la séquence des susdits rétrovirus défectifs et séquences géniques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ces cellules étant elles-mêmes modifiées par incorporation dans leur propre patrimoine génétique desdites séquences géniques ou de provirus défectifs recombinants correspondant auxdits rétrovirus défectifs.

8. Procédé pour la détection d'une infection rétrovirale dans un échantillon contenant des cellules éventuellement infectées (tel qu'un prélèvement de sérum humain contenant des lymphocytes T4, s'agissant d'apprécier s'il est infecté par un virus HIV) ou le milieu, tel qu'un surnageant de culture, avec lequel ces cellules avaient auparavant été en contact, caractérisé par les étapes que constituent :

- la mise en contact de cet échantillon avec les cellules contenant la séquence recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, notamment un provirus défectif susceptible d'être lui-même transactivé par l'apport extérieur en rétrovirus éventuellement contenu dans l'échantillon, et ce dans des conditions (notamment de température et de durée d'incubation appropriées) permettant l'infection desdites cellules par le rétrovirus éventuellement présent dans l'échantillon, et
- la détection de l'infection éventuelle desdites cellules par révélation de l'expression du marqueur résultant de la

transactivation de la séquence génique ou du provirus défectif présent dans ces dernières cellules.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le marqueur est constitué par un gène LacZ et que l'expression du gène LacZ est détectée par un substrat spécifique de la  $\beta$ -galactosidase.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la susdite mise en contact est faite en présence d'un principe dont on veut étudier la capacité à interférer avec le pouvoir infectieux du rétrovirus considéré.

11. Nécessaire ou kit permettant la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 10, ce kit comportant :

- des cellules sensibles modifiées contenant le rétrovirus ou provirus recombinant défectif sus-défini,
- des moyens de révélation de l'expression du marqueur, notamment un substrat spécifique de l'enzyme,
- éventuellement les tampons et réactifs nécessaires à la réalisation de la mise en contact, avec l'échantillon biologique, des cellules contenant la séquence génique ou le rétrovirus recombinant défectif à étudier et l'incubation du mélange de réaction dans des conditions permettant l'infection éventuelle de ces cellules au contact de l'échantillon étudié,
- le cas échéant des milieux de conservation ou de culture desdites cellules saines et modifiées.

1/1

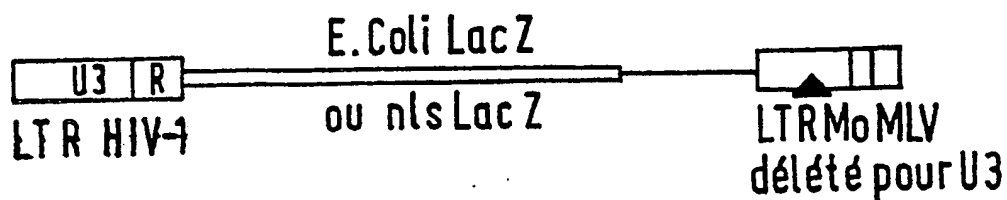


FIG. 1a

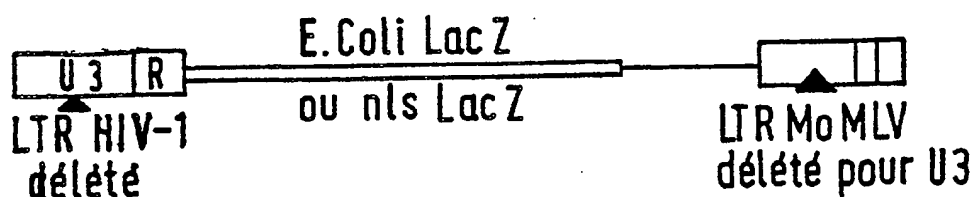


FIG. 1b

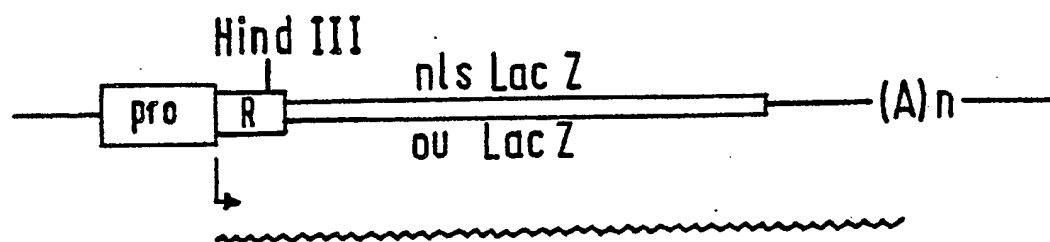


FIG. 2a

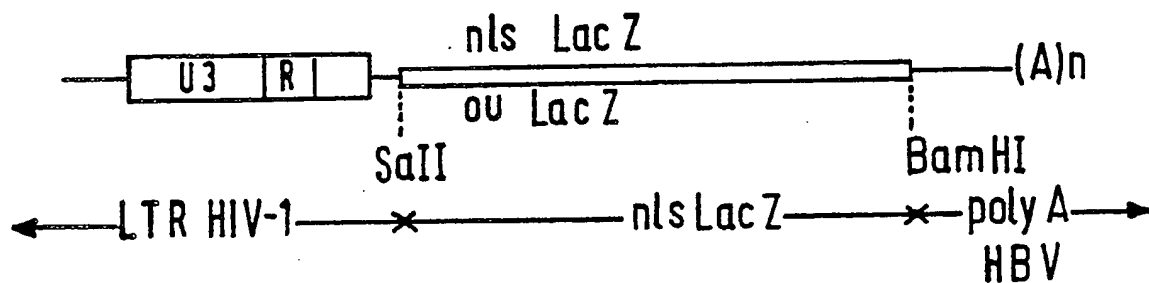
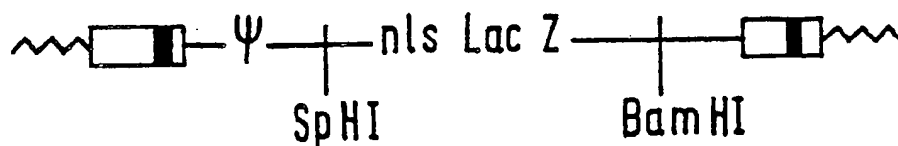


FIG. 2b



HIV nls Lac Z.

FIG. 2c

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00514

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. <sup>4</sup> C12N 15/00;C12N 7/00;C12N 5/00		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>4</sup>	C12N;C12Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Science, vol. 227, 11 January 1985 J. Sodroski et al.: "Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat", pages 171-173 see the whole document particularly figure 1 --	1-4
X	Science, vol. 234, 21 November 1986 C.M. Wright et al.: "Expression and characterization of the transactivator of HTLV-III/LAV virus" pages 988-992 see the whole document --	1-4
A	EP, A, 0233764 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 August 1987 see the whole document --	1-5,7-10
P,X	Science, vol. 239, 8 January 1988, B.K. Felber et al.: "A quantitative bioassay for HIF-1 based on trans-activation" pages 184-187 see the whole article	1-5,7-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
20 January 1989 (20.01.89)	10 February 1989 (10.02.89)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

FR 8800514  
SA 24997

6479 FORM 10479

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0233764	26-08-87	WO-A- 8705048	27-08-87
		AU-A- 7084487	09-09-87
		JP-T- 63502161	25-08-88
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 88/00514

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB <sup>4</sup> :    C 12 N 15/00; C 12 N 7/00; C 12 N 5/00		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>4</sup>	C 12 N; C 12 Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	Science, volume 227, 11 janvier 1985, J. Sodroski et al.: "Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat", pages 171-173 voir l'article en entier, particulièrement figure 1 --	1-4
X	Science, volume 234, 21 novembre 1986, C.M. Wright et al.: "Expression and characterization of the trans-activator of HTLV-III/LAV virus", pages 988-992 voir l'article en entier --	1-4
A	EP, A, 0233764 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 août 1987 voir le document en entier --	1-5, 7-10
P,X	Science, volume 239, 8 janvier 1988, B.K. Felber et al.: "A quantitative bioassay for HIF-1 based on trans-./.	1-5, 7-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 20 janvier 1989	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 10. 02. 89	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé P.C.G. VAN DER PUTTEN	

III. B DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	<p>activation", pages 184-187 voir l'article en entier</p> <p>-----</p>	

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 8800514

SA 24997

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 02/02/89  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0233764	26-08-87	WO-A- 8705048	27-08-87
		AU-A- 7084487	09-09-87
		JP-T- 63502161	25-08-88
-----			

EPO FORM P0472